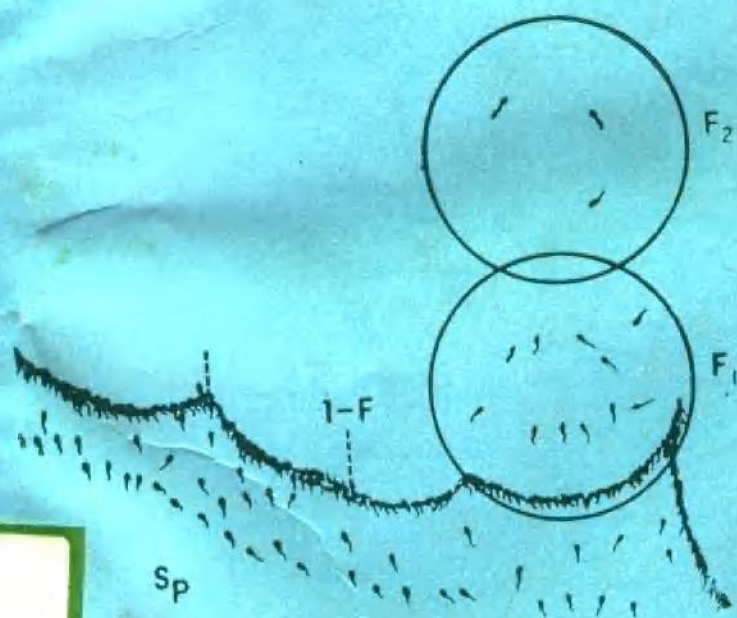


男性学实验手册

徐 崇
刘 莉 编 蒋克钧 审阅
陈 复



科学技术文献出版社重庆分社

男性学实验手册

徐 崇
刘 莉 编 蒋克钧 审阅
陈 复

 科学技术文献出版社重庆分社

责任编辑 潘式文 米德敏
版式设计 王 红
封面设计 王 红

男性学实验手册

徐崇 刘莉 陈复 编

科学技术文献出版社重庆分社 出版

重庆市市中区胜利路132号

新华书店重庆发行所发行

达县新华印刷厂印刷

开本:787×1092毫米1/32印张:3.25字数:69千

1989年9月第1版 1989年9月第1次印刷

科技新书目:201—339 印数1—2,000

ISBN7-5023-0468-1/R·106 定价:1.40元

引 言

男性学 (Andrology) 是主要研究男性生殖科学的学科, 包括男性生殖系统的生理病理, 内分泌, 精子发生和男性生育的调节等。长期以来, 这门学科一直隶属于泌尿科, 妇产科或皮肤病及性病科, 没有受到应有的重视。

男性学作为一门独立的学科, 在国外, 是近十几年才出现的。1976年, 美国成立了美国男性学学会。我国的男性学科学也是近十年兴起的。由于男性学研究不仅具有指导男性生殖系统疾患的诊断治疗, 推动计划生育和控制人口的实际意义, 而且有助于彻底揭示人类生殖的奥秘, 这一学科正受到越来越多的临床医师, 自然科学和社会科学工作者的关注, 并在全国各地迅速发展。按中国政府与世界卫生组织 (WHO) 的协定, WHO曾组织国际知名男性学家于1983, 1984和1987年在成都、南京、武汉举办男性学和生殖免疫学讲习班或召开学术会议, 我国卫生部也于1981年在哈尔滨举办男性学讲习班, 这些都对促进我国男性学事业的发展起了积极作用。

男性学涉及的学科内容很多, 如解剖、生理、病理、生物化学、免疫、遗传以及心理和精神病学等。但是, 目前, 男性学作为一门独立学科, 其系统理论和实验室研究技术都还不完善。临床和科学工作者们日益认识到精液质量和功能特征分析与附性腺分泌功能检查对于男性学和妇产科学研究与临床的重要参考价值。但是, 国内各医疗单位男性学实验

检查技术尚未普及，更没有标准化。近年来，WHO出版的《精液分析和精液—宫颈粘液相互作用检查手册》已为国外许多实验室接受，其推荐的检查技术已成为标准操作方法。本书第一·四章就主要依据该手册（1987年新版）内容编写，其它各章主要参考J.D.Paulson等编Andrology（1986年版）和E.S.E. Hafez编Human Semen and Fertility Regulation in Men（1976年版）并结合编者工作实践编写，旨在向国内生殖医学科学工作者介绍男性学实验室技术，促进其标准化，提高实验结果的精确性和可重复性，以有利于实验室内质量控制和实验室间资料交流与比较。

本书介绍的技术都是在国内实验条件下易于建立的。首先，介绍了人精液分析技术，包括常规的肉眼和显微镜检查，还对各项精液和精子检查参数进行了尽可能详细的讨论，并附有精液分析正常值标准、几个术语和记录表格。另外，还简单介绍了近年来国际上一些新技术和仪器，如电子计算机化的精液自动分析仪，有助于国内同道了解本学科的新进展。随着对精液中“圆形细胞”认识的加深，精液中各类白细胞，未成熟生殖细胞的数量和鉴别也引起人们的兴趣。本手册除了介绍一种简单的识别精液中非精子细胞成分的方法，还列入了单克隆抗体细胞化学技术。

对精浆中几种生化成分的测定可以评价附性腺分泌功能。其中，锌、枸橼酸、酸性磷酸酶和 γ -谷氨转肽酶可以反映前列腺的分泌功能；果糖则是储精囊分泌功能的标志之一；游离L-肉毒碱可能表明附睾的功能；三磷酸腺苷（ATP）浓度则一直被认为是成熟精子功能的一个有意义的指标。虽然所有这些生物化学测定与不育的关系还不明确，但是，这些特殊标志物的生化分析可以对男性附性腺和精子功能评价

提供参考，并可能有助于最终对外源性生物学因素的可能作用和疾病本身有更好的了解。因此，本手册介绍了几个生物化学试验（第二章）。

免疫学因素在生育中的作用已日渐引起我们的重视。据信，在正常育龄人群中，10~15%夫妇患有不育症或生育力低下，其中10~20%可能与免疫学有关；习惯性流产患者中，约40%为原因不明，其中，免疫学因素也占有一定比重。输精管结扎后的男性血液中，抗精子抗体发生频率可高达40~50%，抗精子抗体在不育男女性患者中的检出率均远远高于生育力正常者。抗精子免疫检测已被许多实验室列为常规检查。本手册第三章介绍了几个简单易行的检测精子上或精浆和血清中抗精子抗体的方法。应该指出，这些不同测定所反映的临床意义不尽相同，各试验的相关程度也不一致，不能用一个试验完全代替其它试验。随着抗精子抗体检测药盒的出现，其测定技术有希望较快地普及和标准化。

宫颈粘液作为女性生殖道分泌物，是射出精子进入子宫腔前遇到的最重要的屏障，与生育的成功与否关系很大。所以，这本男性学实验室手册也包括了精子-宫颈粘液接触反应（第四章）。主要介绍了测定精子体外穿透宫颈粘液能力的几个方法，如载玻片法和毛细管试验等显微镜技术，这是除常规精液分析之外评价夫妇生育力的一个有价值的试验。

在男性不育症，尤其是少弱畸精子症（Oligoasthenoteratozoospermia）的治疗中，用丈夫精子进行人工授精使其配偶怀孕的方法占有重要地位。这一治疗方法的效果在很大程度上取决于所用精液的质量。本手册最后一章介绍了几个技术，包括简单的过滤法和较复杂的密度梯度离心技术分离高活动力的优质精子。合理选用这些技术可以提高男性原因

的不育夫妇的妊娠率。显然,这些技术对于体外授精(试管婴儿技术)也是有意义的。

手册的最后这一部分还介绍了几个供研究用的较复杂的技术,如精液细菌培养,精子穿透无透明带金黄地鼠卵试验以及利用单克隆抗体的免疫细胞化学技术在男性学中的应用等。

需要强调的是,由于男性学的发展只有十几年历史,人们对于各个实验研究的临床意义还不尽明瞭,这些试验的结果与男性生育力的关系也未明确肯定。因此,对试验结果的解释应该小心。我们殷切希望,男性学实验室技术的推广和标准化会对我国男性学科学的发展有一定的促进作用。

目 录

引言

第一章 精液常规检查	(1)
第一节 样品的采集和处理	(2)
1. 样品采集	(2)
2. 样品处理	(3)
第二节 肉眼检查	(4)
1. 外观	(4)
2. 量	(4)
3. 稠度	(5)
4. pH	(5)
第三节 显微镜检查	(5)
1. 精子活动度	(5)
2. 精子存活率	(7)
3. 精子计数	(8)
4. 精子自凝现象	(12)
5. 精子形态学分析	(12)
6. 非精子细胞成分	(21)
第二章 精液生物化学分析	(25)
第一节 精浆生物化学分析	(25)
1. 精浆锌测定	(27)
2. 精浆枸橼酸测定	(30)
3. 精浆酸性磷酸酶活力测定	(32)
4. 精浆果糖测定	(34)

第二节 精子生物化学分析.....	(35)
1. 精液ATP测定.....	(36)
第三章 抗精子免疫检查.....	(38)
第一节 精子包被抗体检查.....	(38)
1. 混合抗球蛋白反应 (MAR—试验)	(38)
2. 免疫珠试验 (IBT)	(39)
直接法.....	(40)
间接法.....	(41)
第二节 血清抗精子抗体检测.....	(43)
1. 明胶凝集试验 (kibrick法)	(43)
2. 浅盘精子微凝集试验 (Friberg法, TAT)	(44)
3. 补体依赖性精子制动试验 SIT Isojima法.....	(46)
4. 酶联免疫吸附测定.....	(47)
第四章 精子—宫颈粘液接触反应.....	(50)
第一节 宫颈粘液的性质.....	(50)
第二节 宫颈粘液的采集和保存.....	(52)
1. 样品采集.....	(52)
2. 样品保存.....	(52)
第三节 宫颈粘液的检查.....	(53)
1. 宫颈粘液评分.....	(53)
第四节 精子—宫颈粘液接触反应.....	(55)
1. 体内试验 (性交后试验)	(55)
2. 体外试验.....	(58)
玻片法.....	(58)
精子—宫颈粘液接触试验.....	(60)
精子—宫颈粘液毛细管试验.....	(61)
第五章 几个特殊试验.....	(65)

第一节 精液细菌培养.....	(65)
1. 精液中需氧菌培养技术.....	(65)
第二节 精子功能性试验.....	(67)
1. 无透明带金黄地鼠卵穿透试验.....	(67)
第三节 精子分离技术: 精液中高活力精子的分离	(71)
1. 玻璃纤维过滤技术.....	(71)
2. 离心和精子上游技术.....	(72)
3. 牛血清白蛋白上游技术.....	(72)
4. 密度梯度离心法分离高活力成熟精子.....	(73)
5. 几种实验室技术在AIH中的选择应用.....	(75)
第四节 精液细胞化学技术.....	(76)
1. 单克隆抗体细胞化学技术鉴别精液中白细胞 亚类.....	(76)
2. 免疫荧光染色技术.....	(79)
附录.....	(82)
I. 精液分析正常值.....	(82)
II. 几个精液指标术语.....	(84)
III. 精液分析记录表(WHO推荐).....	(85)
IV. 宫颈粘液评分和性交后试验记录表(WHO 推荐).....	(87)

第一章 精液常规检查

精液是男性生殖道分泌并排出的液体,由精浆、精子和其它细胞成分组成。正常精液为乳白色弱碱性液体,有特殊臭味。精浆是附睾、输精管、精囊腺、前列腺和尿道球腺分泌液的混和物,其中以前列腺和精囊腺的分泌物最多。

精子由睾丸曲细精管的生精上皮产生。正常男子,每克睾丸组织每日能产生约1000万个精子。一般在14岁时开始有精子生成,40岁以后生精能力逐渐减弱。新生成的精子在睾丸内尚未成熟,移居到附睾5~25天后才能逐渐成熟并获得受精能力。

在男性生殖道中,约70%精子贮存于附睾,30%贮存于输精管壶腹部中。精子在生殖道中存留过久则会逐渐衰老,失去受精能力。其在男性生殖道中的寿命一般为28天。但是,也有研究报告,输精管结扎后6~12个月,仍可在输精管壶腹部发现活动的残余精子。射入女性生殖道后,精子的运动力可维持1~3天,但受精能力仅能维持一天。

新鲜射出精液接触空气后即呈粘稠的胶胨状,经5~30min液化。这种液态—胶胨—液态变化,与精液中含有的多种酶有关。另外,精液中还含多种成分,如果糖、枸橼酸、酸性磷酸酶、前列腺素、锌、钙、镁、钾、钠和多种激素。

通过精液分析,可以了解睾丸的生精功能,精子数量和质量的各种参数,附性腺的分泌功能以及抗精子免疫的存在。因此,精液常规分析是男性生殖系统疾患、男性不育症的诊

断和疗效评价的基本检查。

第一节 样品的采集和处理

1. 样品采集

精液的采集时间和方法对于精液分析影响很大，必须严格规定并向受试者明确解释。

(1) 采集样品前应禁欲至少48h，但不应长于7天。

对初次接受检查的病例，应该连续采集两次样品。两次的间隔时间应该依据具体情况，但不宜短于7天或长于3个月。如果两次结果明显不同，应该再次进行精液分析，因为即使同一个体，精子生成也可因各种因素影响而明显不同（图1-1）。

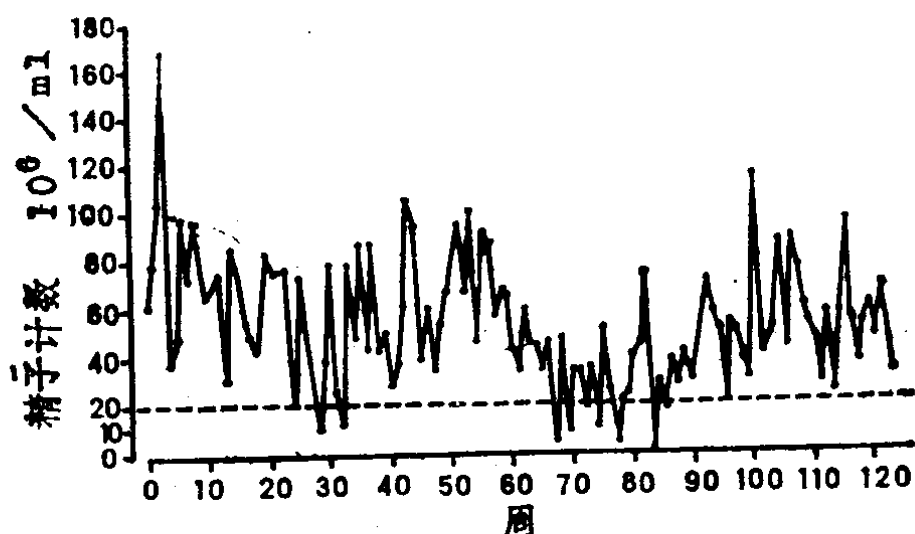


图1-1 精液中精子浓度的周间变异

一位健康男性在120周内连续每二周测定一次精子计数，精子浓度显示显著的变异。整个测定期间未服用任何药物，无任何周期性发热。水平虚线表示精子浓度正常值下限临界值($20 \times 10^6/\text{ml}$)。（取自WHO手册，1987）

(2) 最好在实验室附近的单独房间里采集样品，如果条

件不允许，应该于收集后1 h内送到实验室。如果精子活力低于正常(快速直线前向运动者低于25%)，复查时，应于采集后尽可能早地进行检查。如果进行精子的功能性试验，例如无透明带金黄地鼠卵细胞穿透试验，必须于射精后1 h内将精子分离。

(3) 用手淫法获取标本，精液射入一干净广口玻璃或塑料容器。如用塑料容器，应保证其对精子没有毒性作用。容器上应贴上明显标签，写明受试者姓名，禁欲时间，采集日期和时间。容器应保温，以减少“冷休克”发生。

(4) 如果要进行微生物学检查，病人应先排小便，然后冲洗双手和阴茎，并将标本收集入一消毒容器内(见第五章)。采集精液时，不能使用润滑剂。

(5) 不能使用普通避孕套采集精液，因为它可能干扰精子的存活力。特殊情况下不能通过手淫射精时，可用特殊塑料避孕套收集精液，或将避孕套内滑石粉、润滑液洗净再用。不能用性交中断法收集精液，因为这样可能丢失射出精液的第一部分，而这一部分通常含有高浓度精子；此外，样品也可能被细胞和微生物污染，并且阴道液酸性pH将影响精子的活力。

(6) 收集不完全的样品不能进行分析，特别在丢失了射出精液的第一部分时。

(7) 样品在送往实验室途中，应保持在恒定温度(不低于20℃，且不超过37℃)。

2. 样品处理

(1) 实验人员在收到样品后，应立即在实验记录上准确记录受试者姓名，精液采集日期、时间、禁欲时间和收到样

品的时间。

(2) 样品在分析之前应保存在37℃培养箱中，避免接触有害气体。

(3) 必须强调指出，精液标本可能含有有害病毒，例如肝炎病毒、人类自身免疫缺陷综合症即艾滋病（AIDS）病毒、疱疹病毒，处理时应特别小心，最好能戴乳胶手套。分析过的样品应先经消毒处理再丢弃。

第二节 肉眼检查

一、外观

室温下先以肉眼观察精液标本。正常的标本为灰-乳白色，均匀胶冻状，室温下60min内液化。在某些病例，60min仍不能完全液化。

如果精子浓度太低，标本外观可能清亮。当精液中有红细胞存在时，标本可能呈黄棕褐色。粘液丝块存在为不完全液化征象，可能干扰记数。

正常精液标本也可能含有不能液化的胶冻状颗粒。

标本应在液化后或射精后1h内立即检查。遇有不液化时，需要进行另外处理（例如加入菠萝蛋白酶）以利于标本的分析。

二、量

在原容器内充分混匀标本，用量筒、注射器或吸管测量精液体积。如果进行生物学分析或精液培养，在处理精液标本时，应该使用消毒器具。

三、稠度

液化后的样品稠度（有的书中称为粘度）的测定方法是将精液推过一注射器针头（6 $\frac{1}{2}$ ”，内径约0.8mm）并观察粘丝长度估计稠度。正常标本离开针头后，分离成小滴。在稠度不正常的病例，小滴可能变为长于2cm的粘丝。另外，也可以用下法测定稠度：在标本中插入一玻璃棒，观察提起玻璃棒时粘着的粘丝长度。粘丝的长度不应长于2cm。

四、pH

于射精后1h之内进行测定。在精密pH试纸（pH6.4~8）上滴一滴精液，30s后，浸润处的颜色应该均匀，对照标准色条确定其pH值。

常规精液分析前应用标准溶液检查所用pH试纸的准确性。

正常精液pH值为7.2~7.8。如果大于7.8，应考虑感染的可能。反过来，如果精液pH低于7，并伴有无精子症，则可能存在输精管、精囊或附睾的发育异常。

第三节 显微镜检查

样品的显微镜分析，包括精子存活率，活动度和计数测定，染色后形态学观察，除精子以外的其它细胞成份和精子凝集现象的检查。

一、精子活动度

近年来，出现了许多对人精子运动特征进行客观评价的

新技术，包括定时曝光、电子计算机化电视显微技术和激光技术等，可以分析单个精子的各种运动参数。为了便于使用，本手册主要介绍无需复杂设备、且能较满意测定精子活动度的简易方法，并简要介绍某些新技术，有兴趣的实验人员可参阅有关文献。

用微量吸管或带有6½号针头的注射器将定量(10~15μl)精液滴加在一清洁载玻片上，盖上一20×20mm~24×24mm盖玻片，静置约1min，盖玻片的重量能将样品展开并使之稳定，有利于观察。在显微镜下以400~600×放大倍数检查。使用普通显微镜时，将聚光镜下降，使光线弥散，可用于未染色标本的检查。当然，相差显微镜的效果更好。

按一定观察路线检查显微镜视野，对所观察的每一个精子进行活动度分类。精子活动度可按以下标准分为a、b、c、d四级：

a. 精子呈快速直线前向运动（以前称为前向运动 极佳或好）。

b. 精子缓慢且不活跃地直线前向运动（以前称为“弱”或中等前向运动）。

c. 无前向运动。

d. 不活动。

通常，必须仔细检查4~6个视野，计数100个正常精子，并进行分类，计算出每种活动度精子的百分率。最好能用第二滴精液同法重复检查一次。可用血球分类计数器帮助分类计数。

〔评注〕

(1) 精液的体积和盖玻片的尺寸的标准化很重要，以保证每次检查标本厚度（即25~30μm）一致。这一厚度可满

足正常精子进行旋转运动需要的空间。

(2) 检查时, 室温应为 $18\sim 24^{\circ}\text{C}$, 低于或高于此温度时, 精子活动度将发生改变。

二、精子成活率

如果不运动精子超过60%, 应用超活精子染色技术确定活精子的比率。该技术原理为死细胞的浆膜损坏后可吸收染料, 因而被染上颜色, 活精子则可以排斥染料而不着色。由于外界环境对精子存活影响甚大, 应于精液液化后尽快进行这一检查。

可用两种方法进行染色: 湿片伊红单染或干片苯胺黑和伊红联合染色。

这些技术可验证活动度测定的准确性, 死精子的百分率应不超过不运动精子的百分率。大量存活但不运动的精子可能说明鞭毛存在结构缺陷。

1) 伊红单染 (Eliasson法)

〔试剂〕

伊红Y: 用生理盐水配成0.5% (w/v) 溶液。

〔染色步骤〕

①在显微镜载玻片上滴加一滴 ($10\sim 15\mu\text{l}$) 新鲜精液与一滴0.5%伊红溶液, 混合均匀, 盖上一片盖玻片。

② $1\sim 2\text{ min}$ 后, 在光学显微镜或相差显微镜下 ($400\times$) 观察100个精子。

结果计算: 活精子未着色, 死精子则染为红色。计算每100个精子中活精子的百分率, 即为存活率。

2) 伊红-苯胺黑染色 (改良Blom氏法)

〔试剂〕